

Patent Abstracts of Japan

PUBLICATION NUMBER : 2002080476
PUBLICATION DATE : 19-03-02

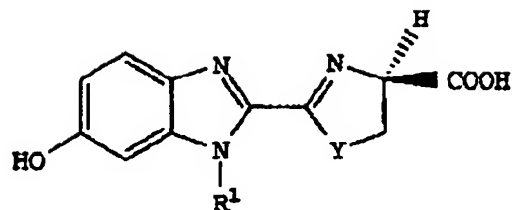
APPLICATION DATE : 31-08-00
APPLICATION NUMBER : 2000264156

APPLICANT : IATRON LAB INC;

INVENTOR : HOSHINO NOBUHIRO;

INT.CL. : C07D403/04 C07D413/04 C07D417/04

TITLE : D-LUCIFERIN ANALOGUE, REAGENT
FOR ANALYZING LUCIFERASE
ACTIVITY, AND REAGENT FOR
ANALYZING ATP



ABSTRACT : PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a D-luciferin analogue capable of being preserved for a long period even in a solution and to provide a reagent for analyzing luciferase activities and a reagent for analyzing ATP capable of being preserved for a long period even in a solution.

SOLUTION: This D-luciferin analogue is represented by general formula (I) [concretely, e.g. (S)-2-(6-hydroxy-1-methylbenzimidazol-2-yl)-2-thiazoline-4- carboxylic acid]. The reagent for analyzing the luciferase activities and the reagent for analyzing the ATP contain the D-luciferin analogue represented by the general formula (I).

COPYRIGHT: (C)2002,JPO

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2002-80476

(P2002-80476A)

(43) 公開日 平成14年3月19日 (2002.3.19)

(51) Int.Cl.⁷

識別記号

F I

テーマコード (参考)

C 0 7 D 403/04

C 0 7 D 403/04

4 C 0 6 3

413/04

413/04

417/04

417/04

審査請求 未請求 請求項の数 3 O L (全 12 頁)

(21) 出願番号 特願2000-264156 (P2000-264156)

(71) 出願人 000138277

株式会社ヤトロン

東京都千代田区東神田 1 丁目 11 番 4 号

(22) 出願日 平成12年8月31日 (2000.8.31)

(72) 発明者 今西 武

奈良県奈良市千代が丘 2 - 2 - 18

特許法第30条第1項適用申請有り 平成12年3月5日
日本薬学会第120年会組織委員会発行の「日本薬学会第
120年会要旨集 1」に発表

(72) 発明者 宮下 和之

大阪府箕面市半町 3 - 15 - 41 セレコート
箕面208

(72) 発明者 星野 信広

東京都千代田区東神田 1 丁目 11 番 4 号 株
式会社ヤトロン内

(74) 代理人 100090251

弁理士 森田 憲一

最終頁に続く

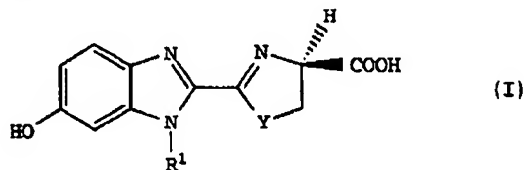
(54) 【発明の名称】 D-ルシフェリン類縁体並びにルシフェラーゼ活性分析用試薬及びATP分析用試薬

(57) 【要約】

【課題】 溶液中においても長期に保存可能であるD-ルシフェリン類縁体、並びに溶液状でも長期に保存可能なルシフェラーゼ活性分析用試薬及びATP分析用試薬を提供する。

【解決手段】 一般式 (I) で表されるD-ルシフェリン類縁体 [具体的には、例えば、(S)-2-(6-ヒドロキシ-1-メチルベンズイミダゾール-2-イル)-2-チアゾリン-4-カルボン酸]。前記ルシフェラーゼ活性分析用試薬及びATP分析用試薬は、前記一般式 (I) で表されるD-ルシフェリン類縁体を含有する。

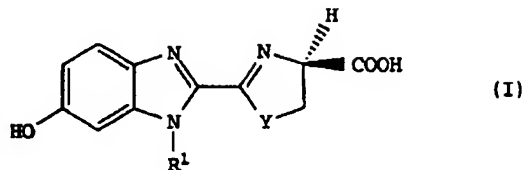
【化1】



【特許請求の範囲】

【請求項1】 一般式 (I) :

【化1】



〔式中、Yは、-S-、-O-、又は-N(R²)-であり；R¹及びR²は、それぞれ独立に、水素原子、ベンジル基、又は炭素原子数1～4のアルキル基である〕で表されるD-ルシフェリン類縁体。

【請求項2】 請求項1に記載のD-ルシフェリン類縁体含有することを特徴とする、ルシフェラーゼ活性分析用試薬。

【請求項3】 請求項1に記載のD-ルシフェリン類縁体含有することを特徴とする、ATP分析用試薬。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、新規のD-ルシフェリン類縁体、並びにルシフェラーゼ活性分析用試薬及びATP分析用試薬に関する。本明細書における「分析」には、分析対象物質の存在の有無を判定する「検出」と、分析対象物質の量を定量的又は半定量的に決定する「測定」とが含まれる。

【0002】

【従来の技術】蛍の発光は、発光収率が高く、少ないエネルギーで強い発光を示すことから、従来から種々の分析に用いる努力がなされてきた。この発光反応が、酵素であるルシフェラーゼ、基質であるルシフェリン、並びにアデノシン三リン酸(ATP)及びMgイオンの存在により起こることが解明されたことによって、初期には、ATPの高感度測定に用いる検討が精力的になされた。この場合には、ATPが測定対象物質であるため、発光反応に必要な他の成分、すなわち、ルシフェラーゼ、ルシフェリン、及びMgイオン等の混合物を試薬化し、被検サンプルに前記試薬を加えて起こる発光反応を、光電子倍增管を備えた発光検出器で測定する方法が採られた。

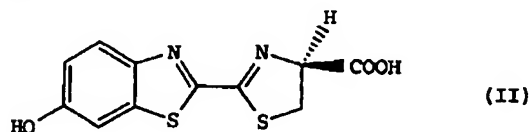
【0003】前記ATP測定用試薬の原料としては、蛍をすりつぶして得られる抽出液が用いられていたが、その抽出液は安定性が悪く、従って、同じ量のATPを測定しても、試薬調製後の時間経過に伴い、発光反応が弱くなることが知られていた。この現象を分析した結果、この不安定性の原因は、酵素であるルシフェラーゼ、及び基質であるルシフェリンの両者が不安定であるために起こっていることが解明された。このように、前記ATP測定用試薬は、不安定な酵素と基質との組み合わせで構成されているため、試薬を凍結乾燥して保存し、測定

直前に溶解するという使用上の制約があり、従って、この測定技術は広く使われるには至らなかった。

【0004】最近、遺伝子操作の技術が進歩し、蛍ルシフェラーゼの遺伝子配列に変異を加え、安定なリコンビナントルシフェラーゼを調製することが可能となってきた。この技術により試薬の一方の成分である酵素の安定化が飛躍的に向上したが、基質であるルシフェリンの安定化については対策のないままであった。

【0005】試薬のもう一方の成分であるD-ルシフェリンは、式(II) :

【化2】



で表される化合物であり、北アメリカ産ホタルからマッケルロイ(McElroy)らによって1957年に単離され、ホワイト(White)らによって1961年に構造決定が行われた。その生合成は、キノンとD-システインとを出発材料にして行われると考えられ、更に、L体は発光しないことが知られている。発光反応には、チアゾリン環のカルボキシル基が関与し、ジオキセタン構造を経由して発光反応が起こると考えられている。

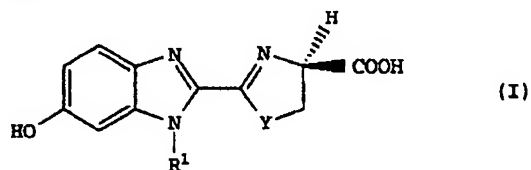
【0006】

【発明が解決しようとする課題】天然のD-ルシフェリンは、発光反応に最適な弱アルカリ性溶液中では安定性に乏しく、溶液状試薬の長期使用という目的には適さない。本発明者は、ルシフェリン類縁体について鋭意研究を重ね、以前にも、天然のルシフェリン分子が有する2つのイオウ原子の一方又は両方を酸素原子に置換したベンゾオキサゾール型D-ルシフェリン類縁体について報告している。本発明者は、別のルシフェリン類縁体について更に鋭意研究を重ねたところ、天然のルシフェリン分子が有するベンゾチアゾール環のイオウ原子を、窒素原子又は置換された窒素原子に置き換えることにより、溶液中でも長期に保存可能である新規のルシフェリン類縁体を新たに見出した。本発明は、こうした知見に基づくものである。

【0007】

【課題を解決するための手段】本発明は、一般式 (I) :

【化3】



〔式中、Yは、-S-、-O-、又は-N(R²)-で

あり； R^1 及び R^2 は、それぞれ独立に、水素原子、ベンジル基、又は炭素原子数1～4のアルキル基である]で表されるD-ルシフェリン類縁体に関する。また、本発明は、一般式(I)で表されるルシフェリン類縁体を含有することを特徴とする、ルシフェラーゼ活性分析用試薬及びATP分析用試薬にも関する。

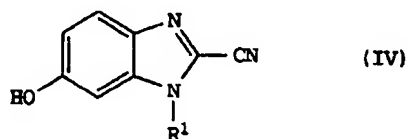
【0008】

【発明の実施の形態】前記一般式(I)において、炭素原子数1～4のアルキル基には、直鎖状アルキル基及び分枝状アルキル基の両方が含まれ、例えば、メチル基、エチル基、*n*-プロピル基、*i*-プロピル基、*n*-ブチル基、*s*-ブチル基、又は*t*-ブチル基を挙げることができる。前記アルキル基としては、炭素原子数1～2が好ましく、メチル基が特に好ましい。

【0009】本発明においては、前記一般式(I)において、 R^1 及び Y の組合せが、水素原子及び-S-、ベンジル基及び-S-、メチル基及び-S-、エチル基及び-S-、プロピル基及び-S-、ブチル基及び-S-、又はイソプロピル基及び-S-の各組み合わせであるD-ルシフェリン類縁体が好ましく、メチル基及び-S-の組み合わせであるD-ルシフェリン類縁体が特に好ましい。

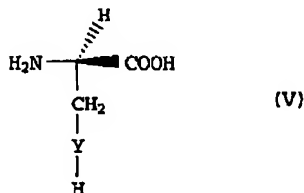
【0010】本発明による一般式(I)で表されるD-ルシフェリン類縁体の調製方法は、特に限定されるものではないが、例えば、一般式(IV)：

【化4】



(式中、 R^1 は、前記と同じ意味である)で表される化合物と、一般式(V)：

【化5】



【式中、 Y は、前記と同じ意味である】で表される化合物とを、適当な溶媒(例えば、メタノール-水混合溶媒)中に溶解し、適当なpH調整剤(例えば、炭酸カリウム)の存在下にて、室温で反応させることにより、調製することができる。

【0011】本発明の分析用試薬は、ルシフェラーゼの基質である一般式(I)で表される本発明のD-ルシフェリン類縁体を少なくとも含有する限り、特に限定されるものではなく、その分析対象物質に応じて、その構成成分を適宜決定することができる。

【0012】本発明のルシフェラーゼ活性分析用試薬は、ルシフェラーゼが関与する発光反応に必要な各種成分(但し、分析対象であるルシフェラーゼを除く)の全部又は一部を含有することができ、少なくとも、基質である一般式(I)で表される本発明のD-ルシフェリン類縁体を含有する。ルシフェラーゼが関与する前記発光反応には、酵素であるルシフェラーゼと、ルシフェラーゼの基質となることができる一般式(I)で表されるD-ルシフェリン類縁体と、発光反応に必要なアデノシン三リン酸(ATP)及びMgイオンとが必要である。従って、本発明のルシフェラーゼ活性分析用試薬は、一般式(I)で表されるD-ルシフェリン類縁体を少なくとも含有し、それ以外に、例えば、ATP及び/又はMgイオンを含有することができる。

【0013】また、本発明のルシフェラーゼ活性分析用試薬は、前記の各成分のみからなることもできるし、あるいは、適当な緩衝液[例えば、グッド緩衝剤(例えば、HEPES又はTricine)]を更に含有することもできる。本発明のルシフェラーゼ活性分析用試薬が、緩衝液を含有する場合には、緩衝液以外の成分と緩衝液とを別々の状態で保存し、分析に用いる直前に混合して使用することもできるし、あるいは、緩衝液以外の成分と緩衝液とを予め混合した状態で保存し、そのまま、分析に用いることもできる。本発明のルシフェラーゼ活性分析用試薬においては、溶液中でも長期に保存可能な一般式(I)で表されるD-ルシフェリン類縁体を含有するので、緩衝液以外の成分と緩衝液とを予め混合した状態でも長期に保存することが可能である。

【0014】本発明のルシフェラーゼ活性分析用試薬における各成分の濃度は、これに限定されるものではないが、一般式(I)で表されるD-ルシフェリン類縁体に関しては、0.1mmol/L～10mmol/Lの濃度であることが好ましく、ATPに関しては、5mmol/L～100mmol/Lの濃度であることが好ましく、Mgイオンに関しては、20mmol/L～200mmol/Lの濃度であることが好ましい。

【0015】本発明のルシフェラーゼ活性分析用試薬においては、例えば、分析対象であるルシフェラーゼを含有する(あるいは、含有する可能性のある)被検試料と、本発明のルシフェラーゼ活性分析用試薬とを混合することにより生じる発光を、適当な分析手段(例えば、発光検出器)で検出又は測定することにより、被検試料中のルシフェラーゼ活性を分析することができる。

【0016】また、本発明のATP分析用試薬は、ルシフェラーゼが関与する発光反応に必要な各種成分(但し、分析対象であるATPを除く)の全部又は一部を含有することができ、少なくとも、基質である一般式(I)で表される本発明のD-ルシフェリン類縁体を含有する。従って、本発明のATP分析用試薬は、一般式(I)で表されるD-ルシフェリン類縁体を少なくとも

含有し、それ以外に、例えば、ルシフェラーゼ及び／又はMgイオンを含有することができる。

【0017】本発明のATP分析用試薬においては、前記ルシフェラーゼとして、天然型である蛍ルシフェラーゼを用いることもできるし、あるいは、遺伝子組換え技術により得られる組換え型ルシフェラーゼを用いることもできる。前記組換え型ルシフェラーゼとしては、例えば、平家ボタルの熱安定型変異種の遺伝子を大腸菌において発現させて得られるルシフェラーゼ（例えば、キッコーマン社のルシフェラーゼ）を挙げることができる。

【0018】また、本発明のATP分析用試薬は、前記の各成分のみからなることもできるし、あるいは、適当な緩衝液〔例えば、グッド緩衝剤（例えば、HEPES又はTricine）〕を更に含有することもできる。本発明のATP分析用試薬が、緩衝液を含有する場合には、緩衝液以外の成分と緩衝液とを別々の状態で保存し、分析に用いる直前に混合して使用することもできるし、あるいは、緩衝液以外の成分と緩衝液とを予め混合した状態で保存し、そのまま、分析に用いることもできる。本発明のATP分析用試薬においては、溶液中でも長期に保存可能な一般式（I）で表されるD-ルシフェリン類縁体を含有するので、緩衝液以外の成分と緩衝液とを予め混合した状態でも長期に保存することが可能である。

【0019】本発明のATP分析用試薬における各成分の濃度は、これに限定されるものではないが、一般式（I）で表されるD-ルシフェリン類縁体に関しては、 $0.1\text{ mmol/L} \sim 10\text{ mmol/L}$ の濃度であることが好ましく、ルシフェラーゼに関しては、 $10^{-14}\text{ mol/L} \sim 10^{-8}\text{ mol/L}$ の濃度であることが好ましく、Mgイオンに関しては、 $20\text{ mmol/L} \sim 200\text{ mmol/L}$ の濃度であることが好ましい。

【0020】本発明のATP分析用試薬においては、例えば、分析対象であるATPを含有する（あるいは、含有する可能性のある）被検試料、あるいは、各種酵素反応を経て生成されるATPを含有する（あるいは、含有する可能性のある）被検試料と、本発明のATP分析用試薬とを混合することにより生じる発光を、適当な分析手段（例えば、発光検出器）で検出又は測定することにより、被検試料中のATP量を分析することができる。

【0021】

【実施例】以下、実施例によって本発明を具体的に説明するが、これらは本発明の範囲を限定するものではない。以下の各調製実施例1～10は、図1に示す合成経路に従って実施した。なお、以下の各調製実施例の各標題において各化合物の直後に記載した括弧内の数字は、図1において各化合物の構造式に付与されている式番号を意味する。また、図1及び後述する図2において、記号「Bn」はベンジル基を意味し、以下、同様に、記号「Ac」はアセチル基を、記号「Me」はメチル基を、

記号「TBDMS」はtert-ブチルジメチルシリル基を、そして、記号「NOE」は核オーヴァーハウザー効果をそれぞれ意味する。

【0022】

【調製実施例1】《3-クロロ-4-ニトロフェノール（1）の合成》ベントナイト及び硝酸鉄9水和物から調製したクレイフェン（3.5g）のジエチルエーテル（ Et_2O ）懸濁液（50mL）に、m-クロロフェノール（100mg, 0.778 mmol ）を加え、室温で28時間攪拌した。反応液を塩化メチレンで希釈し、一晚静置した後に、セライト[®]過し、母液を水及び飽和食塩水で洗浄した。乾燥後、溶媒を減圧留去し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（酢酸エチル：ヘキサン＝1：5）により精製し、標記化合物（69.0mg, 51%）を淡黄色結晶として得た。得られた標記化合物の理化学的物性は以下のとおりである。

融点： $122 \sim 124^\circ\text{C}$ （文献値： $121 \sim 122^\circ\text{C}$ ）
IR ν (KBr) cm^{-1} ：3325, 3101, 1596, 1508, 1433, 1355, 1245, 1041

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ ：6.83 (1H, dd, $J=9, 3\text{ Hz}$), 7.01 (1H, d, $J=3\text{ Hz}$), 7.98 (1H, d, $J=9\text{ Hz}$)

$^{13}\text{C-NMR}$ ($\text{DMSO}-d_6$) δ c：114.9, 117.7, 127.9, 128.6, 138.6, 162.2

EI-MS (m/z , %)：173 (M^+ , 100), 143 (63), 99 (51)

元素分析：

計算値 ($\text{C}_6\text{H}_4\text{NO}_3\text{Cl}$ として)：C, 41.52; H, 2.32; N, 8.07; Cl, 20.43

実測値：C, 41.53; H, 2.44; N, 8.03; Cl, 20.34

【0023】

【調製実施例2】《3-ベンジルアミノ-4-ニトロフェノール（2）の合成》前記調製実施例1で調製した3-クロロ-4-ニトロフェノール（2.81g, 16.2 mmol ）をベンジルアミン（13.3mL, 121 mmol ）に溶解させ、 80°C で7日間攪拌した。反応液に5%塩酸を加え、酢酸エチルで抽出した。有機層を水及び飽和食塩水で洗浄し、乾燥後、溶媒を減圧留去した。残渣を酢酸エチル-ヘキサンより再結晶し、標記化合物（2.55g, 64%）を橙色結晶として得た。得られた標記化合物の理化学的物性は以下のとおりである。融点： $195 \sim 198^\circ\text{C}$ （酢酸エチル-ヘキサン）

IR ν (KBr) cm^{-1} ：3195, 1627, 1578, 1525, 1395, 1304, 1175

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ ：4.50 (2H, d, $J=5\text{ Hz}$), 6.12 (1H, d, $J=2\text{ Hz}$), 6.16 (1H, dd, $J=9, 2\text{ Hz}$), 7.30-7.

40 (5H, m), 8.16 (1H, d, $J=9$ Hz), 8.63 (1H, br s)
 $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6) δ c: 45.8, 97.6, 106.3, 124.9, 126.8, 126.9, 128.5, 128.9, 138.2, 147.4, 164.5
 EI-MS (m/z , %): 244 (M^+ , 41), 91 (100)

元素分析:

計算値 ($\text{C}_{13}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_3$ として): C, 63.93; H, 4.95; N, 11.47

実測値: C, 63.82; H, 4.95; N, 11.36

【0024】

【調製実施例3】《4-ベンジルアミノ-4-ニトロフェニル酢酸(3)の合成》前記調製実施例2で調製した3-ベンジルアミノ-4-ニトロフェノール(1.5 g, 6.14 mmol)のピリジン溶液(10 mL)に、0℃で無水酢酸[(AcO) $_2$ O](869 μ L, 9.21 mmol)を滴下し、室温で6.5時間攪拌した。反応液に飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加え、酢酸エチルで抽出し、5% HCl水溶液、水、及び飽和食塩水で洗浄した。乾燥後、溶媒を減圧蒸留し、標記化合物(1.73 g, 98%)を橙色結晶として得た。得られた標記化合物の理化学的物性は以下のとおりである。
 融点: 115~116℃ (酢酸エチル)

IR ν (KBr) cm^{-1} : 3382, 1766, 1627, 1575, 1502, 1252, 1193

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl $_3$) δ : 2.28 (3H, s), 4.50 (2H, d, $J=5$ Hz), 6.44 (1H, dd, $J=9, 2$ Hz), 6.58 (1H, d, $J=2$ Hz), 7.29-7.41 (5H, m), 8.23 (1H, d, $J=9$ Hz), 8.47 (1H, br s)

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl $_3$) δ c: 21.3, 47.3, 106.1, 109.9, 127.8, 128.6, 128.9, 136.6, 146.3, 156.6, 168.2

EI-MS (m/z , %): 286 (M^+ , 42), 226 (44), 105 (87), 91 (100)

元素分析:

計算値 ($\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_4$ として): C, 62.93; H, 4.93; N, 9.79

実測値: C, 62.90; H, 4.96; N, 9.72

【0025】

【調製実施例4】《4-アセチルアミノ-3-ベンジルアミノフェニル酢酸(5)の合成》PtO $_2$ (30 mg)のエタノール(EtOH)-テトラヒドロフラン(THF) (1:1)溶液(3 mL)を、室温常圧にて水素気流下で2時間攪拌した。前記調製実施例3で調製

した4-ベンジルアミノ-4-ニトロフェニル酢酸(400 mg, 1.40 mmol)のEtOH-THF (1:1)溶液(3 mL)を滴下し、室温常圧にて水素気流下で更に6時間攪拌した。触媒を濾去した後、濾液を減圧濃縮し、得られた4-アミノ-3-ベンジルアミノフェニル酢酸(図1において式4で表される化合物)を精製することなく次の反応に用いた。

【0026】4-アミノ-3-ベンジルアミノフェニル酢酸を含む残渣をピリジン(5 mL)に溶解し、0℃で無水酢酸(118 μ L, 1.25 mmol)を滴下し、室温で4時間攪拌した。反応液に水を加え、酢酸エチルで抽出し、水及び飽和食塩水で洗浄した。乾燥後、溶媒を減圧留去し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(酢酸エチル:ヘキサン=1:4)により精製し、標記化合物(340 mg, 82%)を無色針状晶として得た。得られた標記化合物の理化学的物性は以下のとおりである。

融点: 170.5~172℃ (酢酸エチル)

IR ν (KBr) cm^{-1} : 3256, 3038, 2858, 1755, 1653, 1608, 1520, 1428, 1371, 1303, 1220, 1164, 1014

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6) δ : 2.05 (3H, s), 2.17 (3H, s), 4.29 (2H, d, $J=6$ Hz), 5.83 (1H, t, $J=6$ Hz), 6.18 (1H, d, $J=2$ Hz), 6.27 (1H, d, $J=8, 2$ Hz), 7.07 (1H, d, $J=8$ Hz), 7.19-7.37 (5H, m), 9.18 (1H, s)

$^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6) δ c: 20.9, 23.3, 46.1, 104.0, 108.2, 120.9, 126.6, 126.7, 128.2, 139.4, 143.6, 149.0, 168.7, 168.9
 EI-MS (m/z , %): 298 (M^+ , 97), 213 (60), 197 (62), 91 (100)

元素分析:

計算値 ($\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_3$ として): C, 68.44; H, 6.08; N, 9.39

実測値: C, 68.43; H, 6.09; N, 9.42

【0027】

【調製実施例5】《6-アセトキシ-1-ベンジル-2-メチルベンズイミダゾール(6)の合成》前記調製実施例4で調製した4-アセチルアミノ-3-ベンジルアミノフェニル酢酸(248 mg, 0.831 mmol)のベンゼン溶液(30 mL)に、p-トルエンスルホン酸1水和物(p-TsOH \cdot H $_2$ O) (39.5 mg, 0.208 mmol)を加え、ディーン-スターク(Dean-Stark)蒸留器により5日間加熱還流した。反応液を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、水、及び飽和食塩水で洗浄し、乾燥後、溶媒を減圧留去した。残

渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（酢酸エチル：ヘキサン＝4：1）により精製し、標記化合物（224mg, 96%）を無色針状晶として得た。得られた標記化合物の理化学的物性は以下のとおりである。

融点：130-132℃（エチル酢酸）

IR ν (KBr) cm^{-1} : 3068, 2948, 1757, 1453, 1371, 1211

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 2.28 (3H, s), 2.53 (3H, s), 6.96 (1H, dd, $J=8, 2\text{Hz}$), 6.99 (1H, d, $J=2\text{Hz}$), 7.01-7.04 (2H, m), 7.26-7.33 (3H, m), 7.68 (1H, d, $J=8\text{Hz}$)

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) δ : 14.0, 21.1, 47.1, 102.7, 116.0, 119.4, 126.1, 127.9, 129.0, 135.4, 140.4, 146.2, 152.7, 169.8,

EI-MS (m/z , %): 280 (M^+ , 47), 238 (100), 91 (97)

元素分析:

計算値 ($\text{C}_{17}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_2$ として): C, 72.84; H, 5.75; N, 9.99

実測値: C, 72.68; H, 5.82; N, 9.98

【0028】

【調製実施例6】《1-ベンジル-6-ヒドロキシ-2-メチルベンジルイミダゾール(7)の合成》炭酸ナトリウム(1.44g)及び炭酸水素ナトリウム(1.62g)の懸濁液(15mL)に、前記調製実施例5で調製した6-アセトキシ-1-ベンジル-2-メチルベンズイミダゾール(150mg, 0.535mmol)のメタノール(MeOH)溶液(9mL)を滴下し、室温で80分間攪拌した。メタノールを減圧留去後、飽和シュウ酸水を加え酸性にし、酢酸エチルで抽出した。有機層を水及び飽和食塩水で洗浄し、乾燥後、溶媒を減圧留去し、標記化合物(110mg, 86%)を無色針状晶として得た。得られた標記化合物の理化学的物性は以下のとおりである。

融点: 256-260℃（メタノール-エチル酢酸）

IR ν (KBr) cm^{-1} : 3038, 1629, 1487, 1407, 1245, 1205, 1138, 1106

$^1\text{H-NMR}$ (アセトン- d_6) δ : 2.48 (3H, s), 5.38 (2H, s), 6.72 (1H, dd, $J=9, 2\text{Hz}$), 6.75-7.37 (6H, m), 8.14 (1H, brs)

$^{13}\text{C-NMR}$ ($\text{DMSO}-d_6$) δ : 13.6, 46.1, 95.6, 110.6, 118.4, 126.4, 127.3, 128.6, 135.9, 137.0, 150.0, 153.0

EI-MS (m/z , %): 238 (M^+ , 89), 91 (100)

元素分析:

計算値 ($\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}$ として): C, 75.61; H, 5.92; N, 11.76

実測値: C, 75.43; H, 6.02; N, 11.71

【0029】

【調製実施例7】《1-ベンジル-6-(tert-ブチルジメチルシリルオキシ)-2-メチルベンジルイミダゾール(8)の合成》前記調製実施例6で調製した1-ベンジル-6-ヒドロキシ-2-メチルベンジルイミダゾール(110mg, 0.462mmol)のジメチルホルムアミド(DMF)溶液(3mL)に、イミダゾール(108mg, 1.59mmol)及びtert-ブチルジメチルシリルクロリド(TBDMSCl)(199mg, 1.32mmol)を加え、室温で90分間攪拌した。エーテルで希釈後、水及び飽和食塩水で洗浄した。乾燥後、溶媒を減圧留去し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（酢酸エチル：ヘキサン＝1：2）により精製し、標記化合物(140mg, 86%)を無色針状晶として得た。得られた標記化合物の理化学的物性は以下のとおりである。

融点: 90-92℃（エチル酢酸-ヘキサン）

IR ν (KBr) cm^{-1} : 2953, 2858, 1623, 1476, 1401, 1258, 1200, 1133

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 0.12 (6H, s), 0.95 (9H, s), 2.53 (3H, s), 5.23 (2H, s), 6.63 (1H, d, $J=2\text{Hz}$), 6.77 (1H, dd, $J=9, 2\text{Hz}$), 7.04-7.07 (2H, m), 7.26-7.33 (3H, m), 7.53 (1H, d, $J=8\text{Hz}$)

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) δ : -4.4, 14.0, 18.3, 25.7, 47.2, 100.4, 115.7, 119.0, 126.2, 127.8, 128.8, 135.6, 135.7, 137.0, 150.9, 151.5

EI-MS (m/z , %): 352 (M^+ , 100), 295 (93), 91 (32)

元素分析:

計算値 ($\text{C}_{21}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{OSi}$ として): C, 71.54; H, 8.01; N, 7.95

実測値: C, 71.79; H, 7.95; N, 8.01

【0030】

【調製実施例8】《1-ベンジル-6-(tert-ブチルジメチルシリルオキシ)ベンズイミダゾール-2-カルボニトリル(10)の合成》常法に従い、ジイソプロピルアミン(1.03mL, 7.37mmol)及びn-ブチルリチウム-ヘキサン溶液(1.50M, 4.91mL, 7.37mmol)から調製したリチウムジイソプロピルアミド(LDA)のTHF溶液(10m

L) に、窒素気流下-78℃で、前記調製実施例7で調製した1-ベンジル-6-(tert-ブチルジメチルシリルオキシ)-2-メチルベンズイミダゾール

(1.05g, 2.95mmol) のTHF溶液(5mL)を滴下し、-78℃で25分間攪拌した。更に、亜硝酸ブチル(n-BuONO)(1.77mL, 14.7mmol)を加え、-78℃で45分間攪拌した。飽和塩化アンモニウム水溶液を加え、室温に戻した後、反応液を酢酸エチルで抽出し、水及び飽和食塩水で洗浄した。乾燥後、溶媒を減圧留去し、得られたオキシム体(図1において式9で表される化合物)を精製することなく以下の反応に用いた。

【0031】前記オキシム体を含む残渣をベンゼン(30mL)に溶解させ、15分間加熱還流した。塩化チオニル(SOCl₂)(0.269mL, 3.69mmol)を滴下し、更に1時間加熱還流した。室温に戻し、水で希釈後、酢酸エチルで抽出し、水及び飽和食塩水で洗浄した。乾燥後、溶媒を減圧留去し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(酢酸エチル:ヘキサン=1:4)により精製し、標記化合物(540mg, 50%)を無色結晶として得た。

融点: 93.5~95℃(ヘキサン)

IR ν (KBr) cm⁻¹: 2953, 2858, 2235, 1620, 1494, 1402, 1258, 1205, 1106

¹H-NMR (CDCl₃) δ : 0.14 (6H, s), 0.95 (9H, s), 5.46 (2H, s), 6.68 (1H, d, J=2Hz), 6.92 (1H, dd, J=9, 2Hz), 7.21-7.40 (5H, m), 7.69 (1H, d, J=9Hz)

¹³C-NMR (CDCl₃) δ : -4.4, 18.3, 25.7, 49.2, 100.7, 111.4, 119.5, 122.2, 125.7, 127.1, 128.6, 129.1, 134.0, 134.8, 137.7, 155.1

EI-MS (m/z, %): 363 (M⁺, 48), 306 (100), 91 (72)

元素分析:

計算値 (C₂₁H₂₅N₃O Siとして): C, 69.38; H, 6.93; N, 11.56

実測値: C, 69.16; H, 6.94; N, 11.49

【0032】

【調製実施例9】《1-ベンジル-6-ヒドロキシベンズイミダゾール-2-カルボニトリル(11)の合成》前記調製実施例8で調製した1-ベンジル-6-(tert-ブチルジメチルシリルオキシ)ベンズイミダゾール-2-カルボニトリル(20.0mg, 55.0 μ mol)のTHF溶液(3mL)に、HF-NaF緩衝液(pH5)(0.23mL)を加え、室温で30分間攪

拌した。酢酸エチルで希釈後、氷冷下、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加え、酢酸エチルで抽出し、飽和食塩水で洗浄した。乾燥後、溶媒を減圧留去し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(酢酸エチル:ヘキサン=1:3)により精製し、標記化合物(10.0mg, 73%)を淡黄色結晶として得た。得られた標記化合物の理化学的物性は以下のとおりである。

融点: 252~253.5℃(メタノール-酢酸エチル)

IR ν (KBr) cm⁻¹: 3040, 2234, 1624, 1495, 1459, 1408, 1336, 1226

¹H-NMR (CD₃OD) δ : 5.55 (2H, s), 6.84 (1H, d, J=2Hz), 6.95 (1H, dd, J=9, 2Hz), 7.25-7.41 (5H, m), 7.58 (1H, d, J=9Hz)

¹³C-NMR (CD₃OD) δ : 49.3, 96.5, 112.2, 116.9, 122.3, 126.1, 128.1, 129.4, 130.0, 136.3, 136.6, 137.1, 158.7

EI-MS (m/z, %): 249 (M⁺, 53), 91 (100)

元素分析:

計算値 (C₁₃H₁₁N₃Oとして): C, 72.28;

H, 4.45; N, 16.86

実測値: C, 71.99; H, 4.62; N, 16.85

【0033】

【調製実施例10】《(S)-2-(1-ベンジル-6-ヒドロキシベンズイミダゾール-2-イル)-2-チアゾリン-4-カルボン酸(12)の合成》窒素気流下で、前記調製実施例9で調製した1-ベンジル-6-ヒドロキシベンズイミダゾール-2-カルボニトリル(10.0mg, 40.1 μ mol)及びD-システイン塩酸塩1水和物(35.3mg, 0.201mmol)のメタノール(0.7mL)-水(0.35mL)混合溶液中に、炭酸カリウム(16.6mg, 0.120mmol)を加え、室温で30分間攪拌した。1mol/L塩酸によりpH3に調製し、メタノールを減圧留去した後、酢酸エチルで抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し、乾燥後、溶媒を減圧留去し、本発明のD-ルシフェリン類縁体である標記化合物(14.0mg, 99%)を淡黄色結晶として得た。得られた標記化合物の理化学的物性は以下のとおりである。

融点: 132~135℃

IR ν (KBr) cm⁻¹: 2934, 1717, 1603, 1492, 1456, 1395, 1232, 1145, 1044

¹H-NMR (アセトン-d₆) δ : 3.61-3.73 (2H, m), 5.55 (1H, t, J=9Hz),

6.04 (2H, d, $J=4$ Hz), 6.87-6.90 (2H, m), 7.21-7.33 (5H, m), 7.57 (1H, d, $J=9$ Hz) 8.68 (1H, brs)

^{13}C -NMR (DMSO- d_6) δ c: 33.2, 47.4, 79.2, 95.8, 113.9, 120.9, 127.1, 127.3, 128.4, 135.5, 136.9, 137.1, 141.8, 155.6, 162.2, 171.4

【0034】以下の各調製実施例11~17は、図2に示す合成経路に従って実施した。なお、以下の各調製実施例の各標題において各化合物の直後に記載した括弧内の数字は、図2において各化合物の構造式に付与されている式番号を意味する。

【0035】

【調製実施例11】《6-(tert-ブチルジメチルシリルオキシ)-2-メチルベンズイミダゾール(14)の合成》窒素気流下、-78℃で、液体アンモニア(約80mL)にナトリウム(328mg, 14.3mmol)を加え、室温で5分間攪拌した。-78℃下、6-アセトキシ-1-ベンジル-2-メチルベンズイミダゾール(800mg, 2.85mmol)の無水THF溶液(13mL)を加え、1分間攪拌した。塩化アンモニウムを加え、アンモニアを自然蒸発させた後、残渣を酢酸エチルで抽出し、飽和食塩水で洗浄した。乾燥後、溶媒を減圧留去し、得られた6-ヒドロキシ-2-メチルベンズイミダゾール(図2において式13で表される化合物)を精製することなく次の反応に用いた。

【0036】6-ヒドロキシ-2-メチルベンズイミダゾールを含む残渣をDMF(8mL)に溶解し、イミダゾール(971mg, 14.3mmol)及びTBDMSCl(1.29g, 8.56mmol)を加え、室温で12時間攪拌した。反応液をエーテルで希釈後、水を加え、エーテルで抽出し、水及び飽和食塩水で洗浄した。乾燥後、溶媒を減圧留去し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(酢酸エチル)により精製し、標記化合物(679mg, 91%)を無色針状晶として得た。得られた標記化合物の理化学的物性は以下のとおりである。

融点: 148.5~150.5℃(酢酸エチル)

IR ν (KBr) cm^{-1} : 2930, 2857, 1728, 1628, 1458, 1408, 1254, 1167

^1H -NMR (CDCl₃) δ : 0.18 (6H, s), 2.61 (3H, s), 6.76 (1H, dd, $J=9, 2$ Hz), 6.99 (1H, d, $J=2$ Hz), 7.38 (1H, d, $J=9$ Hz), 10.24 (1H, brs)

^{13}C -NMR (CDCl₃) δ c: -4.3, 15.0, 18.3, 25.8, 104.5, 114.8, 1

15.8, 134.0, 138.5, 151.0, 151.3

EI-MS (m/z , %): 262 (M^+ , 42), 205 (100)

元素分析:

計算値 (C₁₄H₂₂N₂O₂Siとして): C, 64.08; H, 8.45; N, 10.67

実測値: C, 64.08; H, 8.40; N, 10.66

【0037】

【調製実施例12】《6-(tert-ブチルジメチルシリルオキシ)-1,2-ジメチルベンズイミダゾール(15a)及び5-(tert-ブチルジメチルシリルオキシ)-1,2-ジメチルベンズイミダゾール(15b)の合成》窒素気流下、水素化ナトリウム(油脂中60%, 68.6mg, 1.71mmol)をヘキサンで洗浄後、無水THF(1mL)で懸濁し、前記調製実施例11で調製した6-(tert-ブチルジメチルシリルオキシ)-2-メチルベンズイミダゾール(300mg, 1.14mmol)の無水THF溶液(1.5mL)を加え、室温で30分間攪拌した。更に、ヨウ化メチル(MeI)(78.3 μ L, 1.26mmol)を加え、室温で2時間攪拌した。反応液に氷水を加えた後、エーテルで抽出し、水及び飽和食塩水で洗浄した。乾燥後、溶媒を減圧留去し、標記化合物2種の混合物(279mg, 88%)を無色針状晶として得た。なお、標記化合物2種の各々は、シリカゲルカラムクロマトグラフィー(クロロホルム:アセトン=10:1)により分離した。得られた各標記化合物の理化学的物性は以下のとおりである。

【0038】《6-(tert-ブチルジメチルシリルオキシ)-1,2-ジメチルベンズイミダゾール(15a)》

融点: 141.5~145℃(酢酸エチル-ヘキサン)
IR ν (KBr) cm^{-1} : 3466, 2934, 2859, 1626, 1476, 1400, 1254, 1209, 1093

^1H -NMR (CDCl₃) δ : 0.20 (6H, s), 1.01 (9H, s), 2.56 (3H, s), 6.70 (1H, d, $J=2$ Hz), 6.75 (1H, dd, $J=9, 2$ Hz), 7.49 (1H, d, $J=9$ Hz)

^{13}C -NMR (CDCl₃) δ c: -4.3, 13.9, 18.3, 25.8, 19.9, 99.8, 115.2, 118.9, 136.2, 137.2, 150.9, 151.3

EI-MS (m/z , %): 276 (M^+ , 78), 219 (100)

元素分析:

計算値 (C₁₅H₂₄N₂O₂Siとして): C, 65.17; H, 8.75; N, 10.13

実測値: C, 65.25; H, 8.67; N, 10.10

【0039】《5-(tert-ブチルジメチルシリルオキシ)-1,2-ジメチルベンズイミダゾール(15b)》

融点: 130~131°C (酢酸エチル-ヘキサン)

IR ν (KBr) cm^{-1} : 3428, 2932, 2858, 1622, 1587, 1514, 1481, 1397, 1257, 1162

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 0.19 (6H, s), 0.99 (9H, s), 2.56 (3H, s), 3.68 (3H, s), 6.80 (1H, dd, $J=9.3\text{Hz}$), 7.09 (1H, d, $J=9\text{Hz}$), 7.14 (1H, d, $J=3\text{Hz}$)

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) δ : -4.4, 13.9, 18.3, 25.8, 29.9, 108.6, 109.1, 115.7, 130.9, 143.0, 151.0, 152.0

EI-MS (m/z , %): 276 (M^+ , 41), 219 (100)

元素分析:

計算値 ($\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{OSi}$ として): C, 65.17; H, 8.75; N, 10.13

実測値: C, 65.25; H, 8.67; N, 10.10

【0040】

【調製実施例13】《6-(tert-ブチルジメチルシリルオキシ)-1-メチルベンズイミダゾール-2-カルボニトリル(17a)及び5-(tert-ブチルジメチルシリルオキシ)-1-メチルベンズイミダゾール-2-カルボニトリル(17b)の合成》常法に従い、ジイソプロピルアミン(251 μL , 1.79mmol)及びn-ブチルリチウム-ヘキサン溶液(1.50M, 1.19mL, 1.79mmol)から調製したLDAのTHF溶液(2.4mL)に、窒素気流下、-78°Cで、前記調製実施例12で調製した6-(tert-ブチルジメチルシリルオキシ)-1,2-ジメチルベンズイミダゾール及び5-(tert-ブチルジメチルシリルオキシ)-1,2-ジメチルベンズイミダゾールの混合物(198mg, 0.716mmol)のTHF溶液(1.2mL)を滴下し、-78°Cで30分間攪拌した。更に、亜硝酸ブチル(429 μL , 3.58mmol)を加え、-78°Cで45分間攪拌した。飽和塩化アンモニウム水溶液を加え、室温に戻した後、反応液を酢酸エチルで抽出し、水及び飽和食塩水で洗浄した。乾燥後、溶媒を減圧留去し、得られたオキシム体(図2において式16で表される化合物)を精製することなく以下の反応に用いた。

【0041】前記オキシム体を含む残渣をベンゼン(2mL)に溶かし、15分間加熱還流した。塩化チオニル

(65.3 μL , 0.895mmol)を滴下し、更に1時間加熱還流した。室温に戻した後、水を加え、酢酸エチルで抽出し、水及び飽和食塩水で洗浄した。乾燥後、溶媒を減圧留去し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(酢酸エチル-ヘキサン=1:10)により精製し、標記化合物17a(49.9mg, 24%)を無色結晶として、標記化合物17b(46.8mg, 23%)を淡黄色針状晶として得た。得られた両標記化合物の理化学的物性は以下のとおりである。

【0042】《6-(tert-ブチルジメチルシリルオキシ)-1-メチルベンズイミダゾール-2-カルボニトリル(17a)》

融点: 109.5~111°C (酢酸エチル-ヘキサン)

IR ν (KBr) cm^{-1} : 3443, 2930, 2858, 2239, 1624, 1497, 1467, 1397, 1268

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 0.24 (6H, s), 1.02 (9H, s), 3.93 (3H, s), 6.79 (1H, d, $J=2\text{Hz}$), 6.95 (1H, dd, $J=9, 2\text{Hz}$), 7.68 (1H, d, $J=9\text{Hz}$)

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) δ : -4.3, 18.3, 25.7, 31.2, 99.8, 111.2, 119.3, 122.0, 125.9, 135.6, 137.4, 155.1

EI-MS (m/z , %): 287 (M^+ , 29), 230 (100)

元素分析:

計算値 ($\text{C}_{15}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{OSi}$ として): C, 62.68; H, 7.36; N, 14.62

実測値: C, 62.66; H, 7.33; N, 14.66

【0043】《5-(tert-ブチルジメチルシリルオキシ)-1-メチルベンズイミダゾール-2-カルボニトリル(17b)》

融点: 170.5~173.5°C (酢酸エチル-ヘキサン)

IR ν (KBr) cm^{-1} : 3467, 2931, 2859, 2237, 1622, 1486, 1266, 1169

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 0.22 (6H, s), 1.00 (9H, s), 3.97 (3H, s), 7.06 (1H, dd, $J=9, 2\text{Hz}$), 7.24 (1H, d, $J=2\text{Hz}$), 7.28 (1H, d, $J=9\text{Hz}$)

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) δ : -4.4, 18.3, 25.7, 31.5, 110.2, 110.3, 111.0, 121.5, 126.7, 129.9, 143.1, 153.2

EI-MS (m/z , %): 287 (M^+ , 73), 230 (100)

元素分析:

計算値 ($C_{15}H_{21}N_3OSi$ として): C, 62.68; H, 7.36; N, 14.62
 実測値: C, 62.61; H, 7.34; N, 14.58

【0044】

【調製実施例14】《6-ヒドロキシ-1-メチルベンズイミダゾール-2-カルボニトリル(18)の合成》前記調製実施例13で調製した6-(tert-ブチルジメチルシリルオキシ)-1-メチルベンズイミダゾール-2-カルボニトリル(8.0mg, 27.8 μ mol)のTHF溶液(0.5mL)に、pH5のフッ化水素-フッ化ナトリウム緩衝液(50 μ L)を加え、室温で4.5時間攪拌した。生じた沈殿をろ取し、標記化合物(4.0mg, 83%)を無色結晶として得た。得られた標記化合物の理化学的物性は以下のとおりである。沸点: 257°C

IR ν (KBr) cm^{-1} : 3037, 2238, 1626, 1469, 1400, 1240, 1122

1H -NMR (DMSO- d_6) δ : 3.88 (3H, s), 6.90-6.93 (2H, m), 7.59 (1H, d, $J=10$ Hz), 9.95 (1H, s)

^{13}C -NMR (DMSO- d_6) δ c: 31.2, 95.1, 111.9, 115.2, 121.2, 124.8, 135.5, 135.9, 156.7

ESI-MS (m/z , %): 173 (M^+ , 100)

元素分析:

計算値 ($C_9H_7N_3O$ として): C, 62.42; H, 4.07; N, 24.27

実測値: C, 62.20; H, 4.27; N, 23.88

【0045】

【調製実施例15】《(S)-2-(6-ヒドロキシ-1-メチルベンズイミダゾール-2-イル)-2-チアゾリン-4-カルボン酸(19)の合成》窒素気流下で、前記調製実施例14で調製した6-ヒドロキシ-1-メチルベンズイミダゾール-2-カルボニトリル(20.0mg, 0.115mmol)及びD-システイン塩酸塩1水和物(101mg, 0.575mmol)のメタノール(2mL)-水(1mL)混合溶液中に、炭酸カリウム(48.0mg, 0.347mmol)を加え、室温で2.5時間攪拌した。1mol/L塩酸によりpH3に調製し、メタノールを減圧留去後、酢酸エチルで抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し、乾燥後、溶媒を減圧留去し、本発明のD-ルシフェリン類縁体である標記化合物(30.3mg, 95%)を淡黄色結晶として得た。得られた標記化合物の理化学的物性は以下のとおりである。

融点: 177~179°C (分解)

$[\alpha]_D^{22}$ -6.1° (c1.00, DMF)

IR ν (KBr) cm^{-1} : 3333, 1700, 159

4, 1384, 1228 1H -NMR (アセトン- d_6) δ : 3.59-3.72 (2H, m), 4.13 (3H, s), 5.54 (1H, dd, $J=9.5, 8.6$ Hz), 6.88-6.93 (2H, m), 7.54 (1H, dd, $J=8.6, 0.8$ Hz), 8.64 (1H, br s)

^{13}C -NMR (アセトン- d_6) δ c: 31.9, 33.3, 79.2, 95.1, 113.7, 120.7, 135.3, 137.9, 142.1, 155.6, 162.1, 171.5

元素分析:

計算値 ($C_{12}H_{11}N_3O_3S \cdot 1/3$ メタノールとして): C, 51.44; H, 4.32; N, 14.59
 実測値: C, 51.55; H, 4.27; N, 14.44

【0046】

【安定性試験例1】《ルシフェリン類縁体の安定性試験》前記調製実施例15で調製した本発明のD-ルシフェリン類縁体である(S)-2-(6-ヒドロキシ-1-メチルベンズイミダゾール-2-イル)-2-チアゾリン-4-カルボン酸を50mmol/L-Tricine \cdot NaOH緩衝液(pH8.5)で1.4mmol/Lの濃度に調整し、試験溶液として4°Cの冷蔵庫に保存し、以下の安定性試験に用いた。保存した当日、保存から3日後、7日後、及び15日後に、冷蔵庫から前記試験溶液を取り出し、反応時には、160mmol/L-ATP及び600mmol/L-MgSO $_4$ を含む1mol/L-Tricine/NaOH緩衝液(pH8.5)と試験溶液とを等量混合し、その混合液50 μ Lを発光測定用白色96穴プレートに分注して試験を行った。測定は発光測定装置ルミノスコト-9000Dで行い、酵素希釈緩衝液[1mmol/L-EDTA, 1mmol/L-2-メルカプトエタノール, 1%牛血清アルブミン, 及び5%グリセロールを含む50mmol/L-HEPES緩衝液(pH7.5)]で調製したルシフェラーゼ溶液50 μ Lを加えた後の10秒間の発光量を測定した。対照試験として、本発明のD-ルシフェリン類縁体である(S)-2-(6-ヒドロキシ-1-メチルベンズイミダゾール-2-イル)-2-チアゾリン-4-カルボン酸の代わりに、D-ルシフェリン(すなわち、天然型ルシフェリン)を用いること以外は、前記操作を繰り返した。

【0047】結果を表1に示す。表1に示す測定値の単位は、「カウント/10秒」である。表1に示すように、D-ルシフェリンを用いた対照試験では、3日後に63%に、15日後に20%に、それぞれ反応性が低下したのに対し、本発明のD-ルシフェリン類縁体を用いると、3日後に101%、15日後に93%の反応性をそれぞれ示し、安定性に優れていることが明らかとなった。

【0048】《表1》

	初日	3日後	7日後	15日後
天然型ルシフェリン	17171	10833	7766	3442
本発明化合物	4764	4812	4984	4439

【0049】

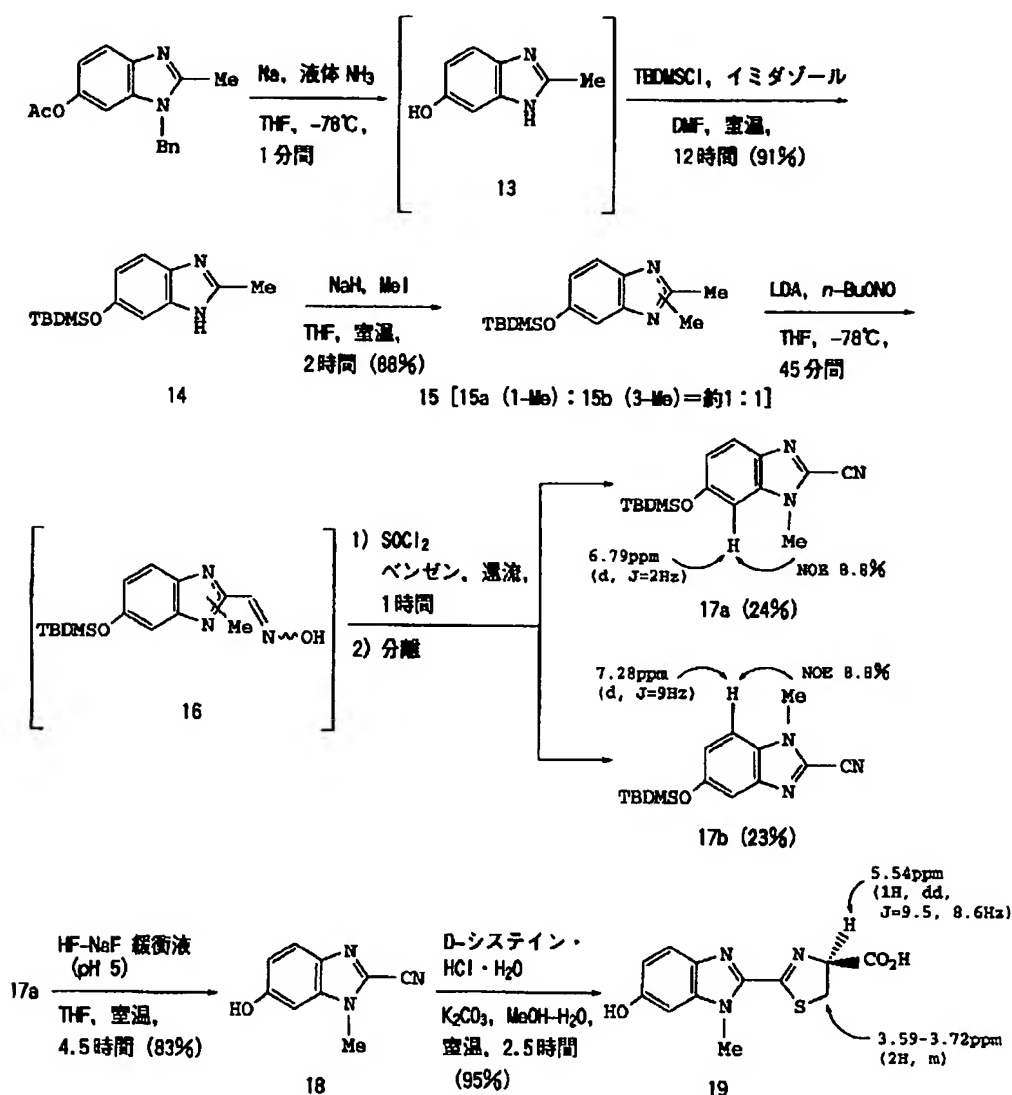
【発明の効果】本発明のD-ルシフェリン類縁体は、溶液中においても長期に保存可能である。従って、本発明のD-ルシフェリン誘導類縁体を用いることにより、溶液状でも長期に保存可能なルシフェラーゼ活性分析用試薬及びATP分析用試薬を提供することができる。

【図面の簡単な説明】

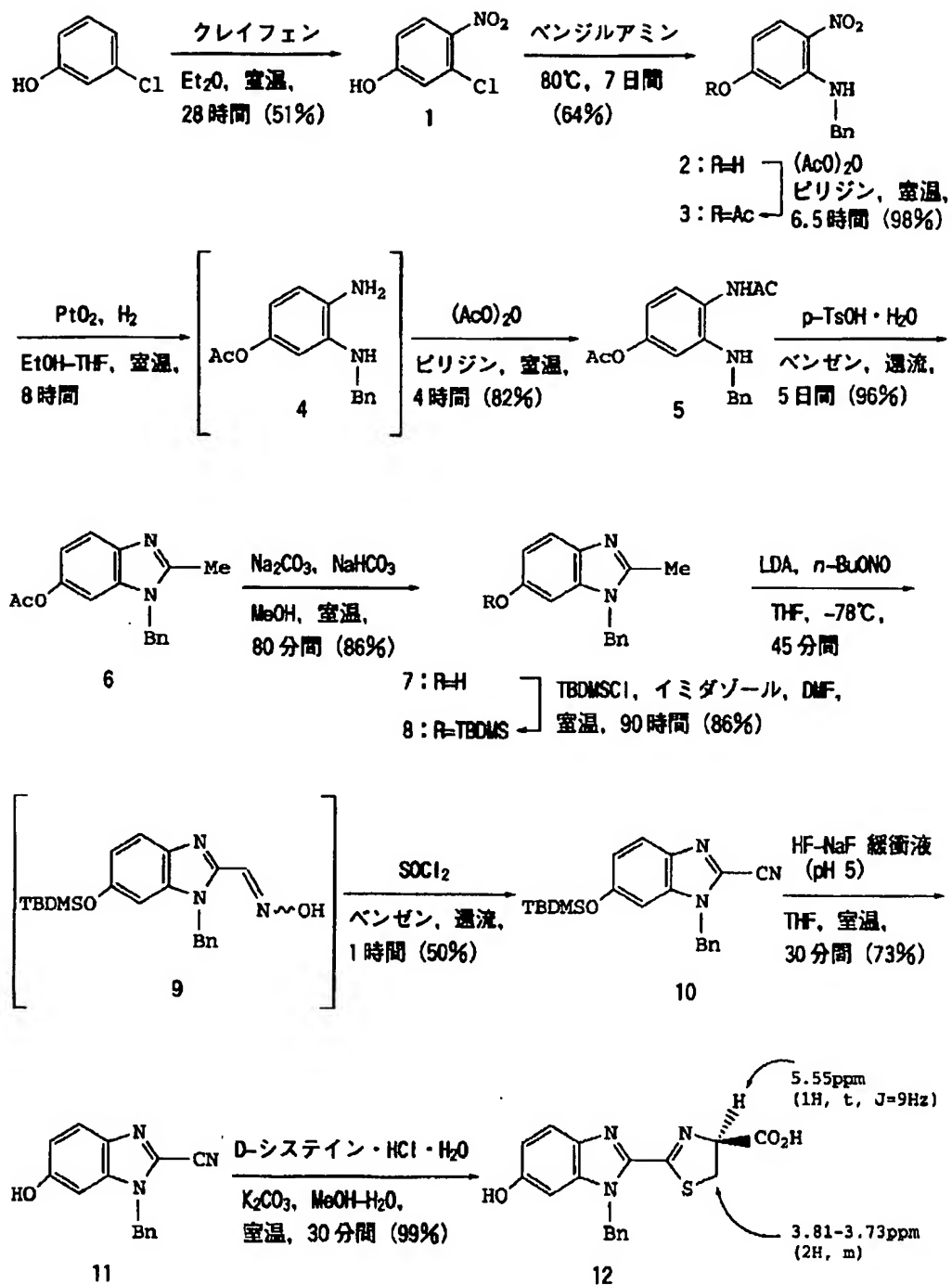
【図1】本発明のD-ルシフェリン類縁体の合成経路を示す説明図である。

【図2】本発明の別のD-ルシフェリン類縁体の合成経路を示す説明図である。

【図2】



【図1】



フロントページの続き

Fターム(参考) 4C063 AA01 BB01 CC26 CC52 CC62
DD25 DD26 EE01